

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 公表特許公報 (A)

⑪ 特許出願公表

昭56—501129

5Int. Cl.³

A 61 K 9/10

A 61 K 9/70

31/71

識別記号

庁内整理番号

7057—4C

7057—4C

6617—4C

⑬ 公表 昭和56年(1981)8月13日

部門(区分) 3(2)

審査請求 未請求

(全 5 頁)

⑭ 感染した骨の処置用のフィブリン / 抗生物質ゲルおよび
その製造方法

⑯ 特 願 昭55—502055

⑰ 出 願 昭55(1980)8月27日

翻訳文提出日 昭56(1981)4月30日

⑱ 国際出願 PCT / EP 80 / 00083

⑲ 国際公開番号 WO 81 / 00516

⑳ 国際公開日 昭56(1981)3月5日

優先権主張 ㉑ 1979年8月31日 ㉒ 西ドイツ(DE)

㉓ P 2935194.8

㉔ 発 明 者 ブラウン・アルニム

ドイツ連邦共和国 D - 6944 ヘムスバッハ

㉕ 出 願 人

・オーベレル・ツアイルベルグウエーク
5

メルク・パテント・ゲゼルシャフト・ミ
ット・ベシユレンクテル・ハフツング
ドイツ連邦共和国 D - 6100 グルムシュタ
ット・フランクフルデル・シュトラッセ
250

㉖ 代 理 人

弁理士 南孝夫

㉗ 指 定 国

A T (広域特許), C H (広域特許), D E
(広域特許), F R (広域特許), G B (広域
特許), J P, N L (広域特許), S E (広域
特許), U S

(13)

特 許 請 求 の 範 囲

1. フィブリンノーゲン、カルシウムイオンに富むスロン
ビン含有溶液およびアミノグリコシド系からの抗生物質
を含有する感染した骨の処置用のフィブリン / 抗生物質
ゲルであつて、前記抗生物質としてトブラマイシン、ゲ
ンタマイシンおよび(または)それらの生理学的に許容
できる塩の1種を含有することを特徴とする、前記フィ
ブリン / 抗生物質ゲル。

2. 溶液低濃度乾燥物または真空凍結乾燥物の形態のヒト
フィブリンノーゲンを抗生物質と無菌条件下に混合し、次
いでカルシウムイオンに富むスロンビン含有溶液を加え
ることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載のゲル
の製造方法。

(1)

明 細 書

感染した骨の処置用のフィブリン / 抗生物質ゲル
およびその製造方法

本発明は感染した骨、特にスタフィロコッカスにより
感染した骨を処置するためのフィブリン / 抗生物質ゲル
およびその製造方法に関する。

骨感染症の局所治療用にポリメチルメタクリレート
(「PMMA」; 骨セメント)に抗生物質を添加混合すること
は知られている。ゲンタマイシン / PMMA ビーズ連続の形
態のゲンタマイシン / PMMA 混合物は骨髄および骨髄感染
症の局所的抗生物質化学療法に特に適している。

移植されたビーズは異物であるから、再び取り除かれ
なければならない。これは、たとえば、最後のビーズを皮膚縫
合から突出させておき、10〜14日後にこのビーズを引
つづけて連続物の全部を引き出すことにより行うことが
できる。しかしながら、このビーズの取出しは総合的に
患者にとって不快な処置であつて、望ましくない。

PMMA ビーズ鎖を使用した場合の欠点を無くし、簡単
な処置方法を可能にするために種々の試みがすでになさ
れている。

たとえば、骨の欠損を充填するために骨移植に関連さ
せてフィブリン膜層系を使用することは既知である

[Bösch 氏等の Archiv für orthopädische und Unfall-
Chirurgie, 90 巻 (1977) 63〜75 頁参照]。この場

(2)

合にはフィブリンを先ず凍ばれた部位に形成させる。すなわちフィブリンノーゲン溶液にスロンビンを加えることにより骨の型洞に凍ばれたフィブリンを形成させる。粉末形フィブリンの市販の複合製剤も必要に応じて加える。

ここに置くべきことに、2種の特定の抗生物質、すなわちトブラマイシンおよびゲンタマイシン並びにその生理学的に許容し得る塩がフィブリンと一緒に感染した骨の処置に特に適しており、そして極めて有効なフィブリン/抗生物質ゲルを形成することが見出された。このフィブリン/抗生物質ゲルは体内でだけ(骨空洞で直接に)調製する必要は必ずしもなく、むしろ構成成分を体外で混合することが好ましい。従って、スロンビンの濃度を定めることにより時間経過に関連するフィブリンの凝固の進行をコントロールできる。

従って、本発明はフィブリンノーゲン、カルシウムイオンに富んだスロンビン含有溶液およびアミノグリコシド群からの抗生物質を含有するフィブリン/抗生物質ゲルであつて、抗生物質としてトブラマイシン、ゲンタマイシンおよび(または)それらの生理学的に許容できる塩の1種を含有することを特徴とする感染した骨の処置用のフィブリン/抗生物質ゲルに関する。

適当な生理学的に許容できる塩は、特に硫酸塩である。ゲルの全ての構成成分は通常の市販製剤の形で使用すると好ましい。

たとえば、ヒトのフィブリンノーゲンはスロンビンで沈

(4)

(たとえば3分まで)維持される。これによりフィブリンの凝固を遅くすることができ、重合体の引裂強さはむしろ増大する。

第1次スポンジ状可塑性を有するフィブリン/抗生物質ゲルは感染を制御するばかりでなく、また生物学的移植の骨形成力を改善する。たとえば複雑骨折のように感染する危険のある骨をフィブリン/抗生物質ゲルで処置して感染を予防することができることも示すまでもない。この処置では、抗生物質が活性化化合物の高い局部レベルに達する。

例 1

1. 実験動物

Weinreb-Nordwieser 種のうさぎ 60 匹を実験動物として選んだ。これらの動物の 22 匹は雌であり、38 匹は雄であつた。平均体重は 4.150 kg である。

2. 実験計画

30 匹の実験動物を無作為に選んだ後、フィブリン/抗生物質ゲルで処置した(A群)。残りの30匹の実験動物は対照群として用い、フィブリンだけで処置した(B群)。両群の動物の骨をスタフィロコッカス・アウレウスで汚染させた。約10日後に動物を殺し、結果を顕微鏡で、細菌学および組織形態学的に検査した。

3. フィブリン/抗生物質ゲルの製造

1. フィブリン溶液剤

フィブリン溶液剤(市販製剤)はヒト供血者の血液か

(3)

特表昭56-501129

凝でできるタンパク質約90%を含有する血液や凍結乾燥物の形で、または凍結乾燥物(たとえばヒト供血者の血液からのヒトの血液から得られる)として、使用する。

スロンビン含有溶液はスロンビン(たとえば粉末形)を塩化カルシウム水溶液に溶解することにより作ると好ましい。塩化カルシウムの濃度は好ましくは約30~50ミリモル/L、特に40ミリモル/Lである。スロンビン濃度が約10~約500 NIH 単位/mL であると好ましい。

上記の抗生物質は体腔と関係した袋で用いると好ましく、1日当りの最高用量を考慮しなければならない。本発明によるゲル中の抗生物質の濃度は好ましくは約1~約10重量%, 特に2~5重量%である。

ゲルはフィブリンノーゲンと抗生物質(たとえばトブラマイシン硫酸塩またはゲンタマイシン硫酸塩、各場合に約5%/(体重%)とを無菌条件下に混合し、次にフィブリンノーゲンをフィブリンに重合させるためにカルシウムイオンに富むスロンビン含有溶液を加えることにより製造できる。このゲルは体外で、すなわち骨空洞に実際に使用する前に、製造すると好ましい。

凝固時間はスロンビン濃度により変化する。従って、1 mL 当り約150 NIH 単位のスロンビン濃度を使用する場合に、形成された凝固物は0.5~1分間の可塑加工性を維持できる。このゲルの流動性はスロンビン濃度を低くする(10~15 NIH 単位/mL)によつて著しく長時間

(5)

ら冷時凝固により製造する。保存するために、仕上げられた製剤を冷凍し、-18℃またはそれ以下で貯蔵する。この溶液はスロンビンにより凝固できるタンパク質を平均90%の量で含有する。溶液の乾タンパク質含有量は約10%である。凝固できるフィブリンノーゲンに加えて、フィブリン凝固剤1%は冷時に不溶性であるグロブリン5~12%, アルブミン最高5%およびフアクタ-XB約10単位を含有し、さらに凝固性のあるプラスミノノーゲンおよび凝固因子の複合体を含有する。

この冷時保存したヒト・フィブリンノーゲンをその調製使用前の約20~30分間に室温で解凍する。この製剤の粘度は温度が上昇するに従い減少する。この製剤を室温で4時間にわたり保持すると、一方で凝固因子の活性化が生じ(凝固)、他方でプラスミノノーゲンの活性化が生起する。解凍したゾル状ヒト・フィブリンノーゲンは簡便注射器で取扱うことができる。実験動物1匹当り0.25 mL を後述の処置のためにペトリ皿に入れる。

2. トブラマイシン含有溶液

実験動物1匹当り15%のトブラマイシン硫酸塩乾燥物質を蒸留水0.1 mL に溶解し、この溶液をフィブリン凝固剤0.25 mL と十分に混合する。

3. カルシウムイオンに富むスロンビン含有溶液

スロンビン乾燥物質(市販製剤)3000 NIH 単位を CaCl_2 3.5 ミリモル/L 含有塩化カルシウム水溶液20

(6)

に溶解する。

IV. 手術技法

アトロピン硫酸塩 0.2 mg およびキシラジン 0.5 ml/kg を麻酔剤投与薬として筋内注射した。骨の手術に十分な麻酔はケタミン 50 mg/kg を用いて約 45 分で達成できた。毛をそった鼠関節に咬創した布地を附けた後に、末梢大腿骨骨端中節を端から露出した。冠状結および拡孔部を用いて、4 × 8 mm の孔を型板を通して皮質に作り、海綿質骨を拡孔部で除去して、約 0.5 mm を満たすことのできる欠損を作った。骨髄の空腔を骨髓内充填用ロウ封剤でふさぎ、血液の流出を止めた。4 × 4 × 1 mm コラーゲンフレームにスタフィロコッカス懸濁液 0.05 ml を接種し、これを骨髄封の汚染に使用した。これは $0.5 - 2 \times 10^7$ 集落形成性単位の菌濃度に相当する。無作為に選択した後に、骨欠損部を A 群ではフィブリン/抗生物質ゲルでそして B 群ではフィブリンで閉塞した。A 群では、末梢大腿骨骨端中節にフィブリン/抗生物質ゲルを充填した。このゲルは重合中、良好な可塑性加工性を有していた。フィブリン凝濁物を外皮部の上から 2 分間、手で圧縮した。B 群（対照群）では、トブラマイシン含有溶液 0.1 ml の代りに蒸留水 0.1 ml を使用したのでフィブリン-ゲル 0.25 ml をスロンビン含有溶液 0.2 ml で凝固させるようにした。

V. 細菌学的方法

ハイデルベルグ大学の整形外科診療室からの細菌スワ

(8)

実験動物の検屍中に採取した骨片を 4 % 中性、緩衝ホルマリン中に固定し、適和な条件下に脱石灰した。脱石灰用溶液はエチレンジアミンテトラ酢酸 4 ナトリウム 200 mg を水で 1000 ml にし、クエン酸で pH を 7.0 ~ 7.2 に調節したものであった。脱石灰処理後に、試料を慣用の方法でパラフィン中に埋め込んだ。3 ~ 5 mm 厚さの層をヘマトキシリン/エオジン、パン・ジーソン染色 (van Dusen's stain)、Di PAS 染色、ギムザ染色およびレダウウィヒ (Ladewig) 染色で、フィブリン証明用のグエイゲルト (Weigert) 法に従い染色した。

結 果

実験動物を処理して 7 日後に殺し、結果を顕微鏡により、細菌学的方法および組織形態学的に評価した。対照 B 群の動物のうち 15 匹が 2 日 ~ 7 日の間に敗血症で死亡した。この群における体重の減少は平均 53.0 % であった。フィブリン/トブラマイシンで処置したうさぎの場合 (A 群) に、感染の結果として死亡した動物はゼロであった。その体重は平均して 13.6 % だけ減少した。

1. 顕微鏡による所見

A 群では、22 匹の実験動物の骨および骨組織上の顕微鏡による所見は原位置に化膿性炎症を示す動物はいなかった。6 匹の動物は軽微な所見を示した。2 匹は細菌性炎症性炎症であると確実に見做された。のこぎり切った場合に、骨は引き裂けて堅固であった。大部分の場合に、フィブリン凝濁物が関節に依然として容易に検出

(7)

特表昭56-501129

ブから単離したコアグユラーゼ陽性のトブラマイシン感受性スタフィロコッカスアウレウス (MIC < 0.125 mcg/ml) を試験菌として使用する。この菌をトリプチカーゼ大豆寒天 (BBL) 上で 37 °C で 18 ~ 24 時間生育させ、次いで殺菌生理学的塩基溶液ですすぐことにより使用する細菌懸濁液を作り、この細菌を含有するすすぎ溶液を約 3×10^8 細菌/ml の菌濃度に濁度比較 (McFarland による硫酸バリウム濁度系の小形管第 1 号) により調節した。懸濁液中の細菌の数 (集落形成性単位) の正確な測定は懸濁液を動物に使用した時点でプレートキャスト法により行なつた。細菌計数用品として次の組成の栄養寒天を使用した (各場合に、水 1000 ml 当りの細菌数)。肉エキス 3、ビツタ (Witto) ペプトン 5、塩化ナトリウム 5 および寒天 12 で pH 7.2。評価を行なうには、関節および関節外組織の標本を殺菌綿スワブで採取し、それぞれ寒天板上の 0.2 % 濃度グルコース栄養ブロス (10 % 羊血添加) にかけた。37 °C で 18 ~ 24 時間インキュベートした後、この栄養培地を菌生育について検査し、濁りまたは集落形成を示さないものはさらに 24 時間インキュベートした。この時点で生育を示さない場合に、この材料は無菌であると考えた。生育したスタフィロコッカスは集落の形成および色について顕微鏡用薄片により、溶血能力により、および結合したコアグユラーゼ (細菌凝集因子) の検出により同定した。

VI. 組織学的方法

(9)

できたが、出血性浸潤があつた。対照 B 群の動物の全部が化膿性炎症の典型的症状を示した。数匹の動物では、傷口からの膿がすでに自然流出し、破裂になつてた。鼠関節の関節周囲組織に、ある時点で膿瘍形成性でありそしてある時点で細菌性炎症である進行性化膿性炎症が全ての動物に検出された。7 匹の動物では、骨が表皮観察鏡のレベルで自然骨折していた。腫瘍を振動のこぎり切ると、赤い萎縮性の骨組織が明白であつた。炎症による破壊的膿瘍性炎症が末梢大腿骨骨端中節に見出された。フィブリン凝濁物は数匹の関節に依然として検出でき、同様に出血性浸潤があつた。

II. 細菌学的所見

全ての動物の関節周囲の組織および末梢大腿骨の両方の手術部分から細菌学的検査用に管内スワブを採取した。A 群の 30 匹のうさぎのうちの 27 匹のスワブは無菌であり、3 匹のスワブは感染していた。これら 3 匹のうち 1 匹に皮下スタフィロコッカスが検出でき、もう 1 匹に骨内スタフィロコッカスが検出でき、さらに 3 匹目の動物に皮下および骨内スタフィロコッカスが検出された。対照群 (B 群) の 30 匹の動物のうち、全てのスワブがスタフィロコッカスで感染していた。この細菌学的調査結果は 4 体表としてまとめることができる。ガイギー & 192 頁 (1973 年) の修正 χ^2 試験による評価は $\chi^2 = 59.64$ を与えた。与えられた有意性の確率 ($P = 0.01$) における有意関係は $X = 6.635$ である。従つて、処置方法に関する試験

(10)

群と対照群とは多くて1%の有意なレベルの差を有する。この統計学的分析によると、フィブリン/抗生物質ゼルにおけるトブラマイシンの局所適用が顕著に有効であると見做される。

II. 組織学的所見

組織検査は全動物の手術部位に特別の炎症の存在を示さなかった。病原菌の選択に応じて、炎症は化膿性であり、何うまでもなく種々の重篤度で発症した。従つて、A群の動物における炎症は平均して重篤度が高かった。広がつたフィブリン残留物がこの群に典型的に検出された。顆粒細胞および若干の大食細胞を含む顆粒化組織がこの残留物の周囲にすてに出現していた。新しく形成された網状骨の骨髄柱がいくつかの場合に検出された。一般に、感染域はこの顆粒化組織により取り囲まれており、末梢に向う骨髄軟骨には損傷がなく、総合的に局所的骨髄炎症であるということができた。細胞浸潤の程度は変化し、腐敗する骨および骨構造は個別の場合に炎症症状と関連するだけであった。これらの場合に、病原菌の検出はまた依然として陽性であった。これに対し、一般にフィブリンだけで処置したB群では一層少ないフィブリンが検出された。多くの場合に、壊死性骨髄炎の重篤な化膿が見られ、多くの場合にこれは末梢に向う骨髄軟骨が侵襲され、骨髄に広がって、周囲骨髄に感染していた。多くの場合に、この症状はまた付近に進行していた。緻密質および残りのスポンジ質の両方が腐骨

(12)

染色セット

この染色セットは次の各構成成分を含有する。

- (a) 塩化カルシウム溶液、40ミリモル/L 4ml
- (b) トロンビン、真空凍結乾燥物 600NIH単位
- (c) ゲンタマイシン硫酸塩 600mg
- (d) フィブリノーゲン、真空凍結乾燥物 800mg

(c)を蒸留水4mlに溶解し、この溶液を蒸留水8ml中の(d)の溶液と混合し、使用する短時間前に、(a)中に(b)を入れた新しく作つた溶液を加える。

(11)

特表昭56-501129

の観点で広い明光を示した。骨再生の開始から見た前症の徴候はいずれの場合にも見られなかった。従つて、抗生物質で局所的に処置した実験動物の場合における炎症は一般に炎症部位に限定され、短かい実験時間後の時点で骨の再生をすてに見ることができのに対し、フィブリンだけで処置した動物では、菌毒性の腐敗が骨髄炎性・膿毒性骨髄炎を誘発し、これはいくつかの場合に阻止できない様相で広がっていた。この組織学的パターンは抗生物質が媒体物質から周囲部分に透過して、病原菌に対し明白に活性になることを示している。

例 2

トブラマイシン硫酸塩の代わりにゲンタマイシン硫酸塩15mgを使用する以外は例1と同様に実験を行なつた。匹敵する結果が得られる。

例 3

染色セット

この染色セットは次の各構成成分を含有する。

- (a) 塩化カルシウム溶液、40ミリモル/L 2ml
- (b) スロビン、真空凍結乾燥物 300NIH単位
- (c) トブラマイシン硫酸塩 350mg

(c)を蒸留水2mlに溶解し、この溶液を約9%フィブリノーゲンの溶解した溶液低濃沈殿物4mlと混合し、使用する短時間前に、この混合物を(a)中に(b)を入れた新に製造した溶液と組合せる。

例 4

国際調査報告

International Application No. PCT/EP80/00083

1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER of number of publications system used, indicate on: According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int. Cl. 3: A 61 K 9/18; A 61 K 31/71; A 61 L 15/06		
2. FIELD SEARCHED		
Classification System: Minimum Documentation Services		
Classification System: Classification System		
Int. Cl. 3:		
Documentation Searched other than Minimum Documentation in the Subject that such Documents are included in the Fields Searched:		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant paragraph	Relevant to Claim No. 1
	Chemical Abstracts, vol. 72, no. 23, 8 June 1970 (Columbus, Ohio, USA); M. Pop, "Experimental covering of the dental pulp in the dog with biological substances", see page 209, column 1, abstract 119944n, Stomatologia 1969, 16(3) 397-403(Rum)	1,2
	Chemical Abstracts, vol. 83, no. 24, 13 December 1976, (Columbus, Ohio, USA), I. Searle, "Tch chemical modification of fibrin film as artificial skin", see page 318, column 1, abstract 182381k, Aichi Ka Dugaku Igakukai Zasshi 1976, 4(3) 183-192(Japan)	1,2
	DE, A, 2651441, published on 24 May 1978, see page 3, lines 16-32; page 4, line 35 - page 6, line 10, page 7, line 18 - page 9, line 25; page 10, lines 4-21; claims 1-8, Merck	1,2
	DE, A, 2511122, published on 23 September 1976, see page 1, line 1 - page 2, line 1; page 2, line 11 - page 3, line 20; figures 1-4; claims 1-5, 11, 12, Kuhn & Co.	1,2
	US, A, 2385802, published on 2 October 1980, see page 1, column 1, line 1 - column 2, line 13; page 1, column 2, line 53 - page 2, column 2, line 22, claims 1-4, J.D. Ferry et al.	1,2
4. CATEGORISATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Meeting of the International Search Report
12 December 1980 (12.12.80)		23 December 1980 (23.12.80)
International Searching Authority		Examiner of International Search Report
European Patent Office		

Form PCT ISA (PCT) November 1979 (October 1978)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE RECORD SHEET		-2-
DE, A, 2852319, published on 9 June 1979, see page 6, line 6, page 7, line 19, line 27 - page 8, line 3, line 23 - page 9, line 7; figure 3, claims 1-13, Euhicon Inc.		1,2
US, A, 3723234, published on 27 March 1973, see column 1, lines 8-10; column 2, lines 32-48; column 6, lines 16-34, J. P. Britton		2
A Chemical Abstracts, vol. 80, no. 13, 1st April 1974, (Columbus, Ohio, USA) JP, A, 73 80 779, Mikuma Hasehara see page 114, column 2, abstract 67835, see the abstract		1,2
<p>VI. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSearchable</p> <p>First international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claim numbers because they relate to subject matter not required to be searched by the Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claim numbers because they relate to parts of the international application that do not comply with the provisions regarding matters to which an international search report cannot be drawn up, specifically:</p>		
<p>VII. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS Lacking</p> <p>The International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:</p> <p><input type="checkbox"/> As an optional additional search fee was timely paid by the applicant, the international search report covers all searchably distinct inventions of the international application.</p> <p><input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, the international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, the international search report is prepared for the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:</p>		
<p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were not reported by applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> The protest substantiated the grounds of additional search fees.</p>		